

Aflatoxines M-45

Prélèvement : Actif sur CIP10-I

Analyse : HPLC détection fluorimétrique

Données de validation _____ Validation complète

Numéro de la méthode _____ M-45

Ancien numéro de fiche _____ 119

Substances

Informations générales

Nom
Aflatoxine B1
Aflatoxine B2
Aflatoxine G1
Aflatoxine G2

Nom	Numéro CAS	Formule Chimique	Masse molaire
Aflatoxine B1	1162-65-8	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,27
Aflatoxine B2	7220-81-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,29
Aflatoxine G1	1165-39-5	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,27
Aflatoxine G2	7241-98-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,29

Substance	données de validation
Aflatoxine B1	Validation_85
Aflatoxine B2	Validation_85
Aflatoxine G1	Validation_85
Aflatoxine G2	Validation_85

Famille de substances

- AGENTS BIOLOGIQUES
- BIOAEROSOLS
- MYCOTOXINES

Principe et informations

La détermination de la concentration en Aflatoxines dans les atmosphères de travail est réalisée par prélèvement de l'aérosol de poussières contaminées à l'aide d'un échantillonneur CIP 10 muni d'un sélecteur de la fraction inhalable haute efficacité et équipé d'une coupelle rotative contenant une mousse filtrante en polyuréthane préalablement lavée (voir dispositif de prélèvement).

La masse d'aérosol prélevé peut être déterminée par pesée des coupelles avant et après prélèvement.

Les aflatoxines sont extraites du média de collecte à l'aide d'un mélange de solvants. La solution d'extraction est ensuite purifiée et concentrée sur colonne d'immunoaffinité. L'analyse est réalisée par chromatographie en phase liquide avec une réaction de dérivation post-colonne et une détection fluorimétrique.

Principe de prélèvement et d'analyse

Etat physique _____ Particules en suspension (liquides ou/et solides)

Type de prélèvements _____ Actif

Principe général et mise en œuvre pratique du prélèvement ¹

¹ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-principe/metropol-prelevement-principe.pdf>

Nom du dispositif _____ CIP10-I

Technique analytique _____ CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

Injecteur _____ PASSEUR A EFFET PELTIER

Détecteur _____ FLUORIMETRIE

Domaine d'application

Substance	Concentration minimum	Volume prélevé
Aflatoxine B1	4 pg/m ³ pour chacune des aflatoxines et 1 mg/m ³ en poussières contaminées	1200 à 4800 L

Liste des réactifs

- ACETONITRILE
- ACIDE NITRIQUE
- BROMURE DE POTASSIUM
- EAU
- METHANOL
- SOLUTION COMMERCIALE PBS pH 7.4

Consignes de sécurité pour les manipulations en laboratoire ²

² <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%20953>

Méthode de prélèvement

Utilisation du dispositif CIP 10 pour le prélèvement d'aérosols³

³ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-cip10/metropol-prelevement-cip10.pdf>

Nombre d'éléments (dispositifs) composant le dispositif en série _____ 1

Dispositif de prélèvement

Type de dispositif _____ ■ CIP10-Inhalable

Support ou substrat de collecte _____ ■ FILTRE EN MOUSSE POLYURETHANE

Préparation du substrat :

Les mousses filtrantes en polyuréthane sont préalablement lavées dans de l'eau savonneuse tiède, rincées à l'eau ultra-pure et séchées, puis lavées à l'acétonitrile et séchées.

Conditionner les coupelles et réaliser la pesée avant et après prélèvement, suivant la méthode décrite dans la fiche " **Analyse gravimétrique** ⁴", pour déterminer la masse des poussières collectées.

⁴ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-gravimetrique/metropol-analyse-gravimetrique.pdf>

Nota : le prélèvement est validé pour des quantités de poussières dans les coupelles comprises entre 1 mg (en deçà, dosages < limites de quantification des mycotoxines) et 60 mg (au-delà, perte d'efficacité de collecte du CIP10).

Commentaires, conseils, consignes :

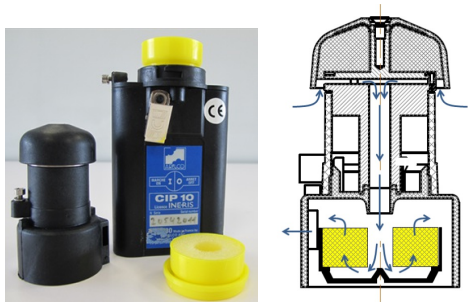


Photo d'un ensemble CIP10-I et représentation **schématique** du sélecteur de la fraction inhalable avec la coupelle rotative en place.

Conditions de prélèvement

Débit (L/min) _____ 10

Temps de prélèvement maximum _____ 8

Préparation des dispositifs de prélèvement en vue d'une intervention en entreprise⁵

⁵ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-intervention-preparation/metropol-intervention-preparation.pdf>

Méthode d'analyse

Principe général de l'analyse en laboratoire⁶

⁶ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-principe/metropol-analyse-principe.pdf>

Préparation de l'analyse

Durée de conservation testée et validée pour les prélèvements _____ 30 jour(s)

Conditions de conservation testée et validée pour les prélèvements :

A température ambiante

Nombre d'étapes de préparation _____ 5

Commentaires sur les étapes :

Avant toutes étapes, réaliser **les pesées⁷** des coupelles après prélèvement.

⁷<https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-gravimetrie/metropol-analyse-gravimetrie.pdf>

La première étape consiste à extraire les poussières contaminées par des aflatoxines, à partir des coupelles, avec un mélange 60/40 méthanol/eau.

La deuxième étape consiste à diluer avec 30 mL de solution PBS.

la troisième étape consiste à fixer et purifier les aflatoxines sur une colonne immunoaffinités(IA), contenant des anticorps monoclonaux spécifiques, greffés sur gel de Sépharose. Ces colonnes doivent être **stockées entre 4 °C et 8 °C** mais **non congelées**.

La quatrième étape consiste à extraire les aflatoxines à partir d' une colonne IA en déposant 2 fois 0,5 mL de méthanol.

La cinquième étape consiste à concentrer **si nécessaire** par évaporation à sec et reprise par 200 µL d' éluant chromatographique.

Durée de conservation testée et validée pour les échantillons préparés _____ 8 jour(s)

Conditions de conservation testée et validée pour les échantillons préparés :

conservation à 4°C

5 étapes de préparation :

Etape de préparation n° 1

Solvant ou solution _____ ■ MELANGE DE SOLVANTS

Type de préparation _____ ■ Extraction

Volume _____ 10 mL

Ultrasons _____ 15 min

Autres conditions de préparation :

Récupération des poussières.

Commentaires :

Récupération des poussières déposées sur les parois de la coupelle en effectuant 3 fois de suite l'étape suivante :

Ajouter 1 mL de solvant d'extraction dans la coupelle, la refermer avec son couvercle et la soumettre 5 minutes aux ultra-sons.

Récupérer la solution d'extraction à l'aide d'une pipette pasteur en matière plastique et la transférer dans le flacon qui contient la mousse.

Etape de préparation n° 2

Solvant ou solution _____ ■ PBS

Type de préparation _____ ■ Dilution

Filtration :

Au besoin

Commentaires :

Dilution avec la solution tampon : Transférer la totalité de la solution d'extraction dans un flacon de 200 mL avec la solution tampon PBS (rincer plusieurs fois le flacon qui contient la mousse avec une portion de solution tampon, aspirer au travers de la mousse avec une pipette pasteur en matière plastique, transférer dans le flacon de 200 mL).

Agiter à l'aide d'un barreau magnétique.

Si la solution est opaque car très chargée en poussières, prévoir une filtration au travers d'un cône en papier filtre (aucune perte de mycotoxines lors de la filtration sur papier filtre n'a été mise en évidence).

Etape de préparation n° 3

Solvant ou solution _____ ■ PBS

Type de préparation _____ ■ Purification

Commentaires :

Utilisation des colonnes d'immunoaffinité (conditionnement, rinçages, pratique ou non du blackflush) à adapter, le cas échéant, aux indications du fabricant.

Transférer la totalité de la solution échantillon sur une colonne d'immunoaffinité.

Prévoir un corps de seringue de 20 à 50 mL comme réservoir de distribution, à remplir en plusieurs fois, pour transférer tout le volume de solution sur la colonne

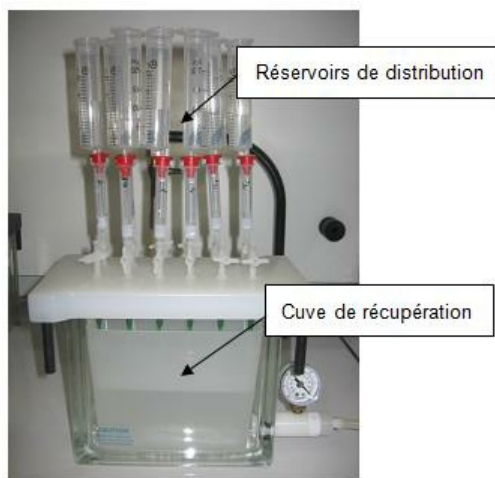
En cas de difficulté d'écoulement, amorcer celle-ci à l'aide d'un faible vide (ne jamais dépasser 5 bars).

Éliminer le mélange de solvant par soutirage sous vide (ne pas amener à sec) dans la cuve de récupération. Les mycotoxines sont maintenant liées aux anticorps monoclonaux spécifiques.

Rincer la colonne IA avec 2 fois 10 mL (par exemple) d'eau, préalablement versés dans le flacon de 200 mL ayant contenu la solution échantillon (pour une récupération complète de celle-ci).

Éliminer l'eau par soutirage à sec, en douceur et en s'assurant qu'il soit complet.

Ci-dessous : photo du dispositif.



Étape de préparation n° 4

Solvant ou solution _____ ■ MELANGE DE SOLVANTS

Type de préparation _____ ■ Extraction

Commentaires :

Protocole d'extraction à adapter, le cas échéant, aux indications du fabricant (en particulier pour la pratique ou non du backflush).

Remplacer la cuve de récupération par le portoir équipé des flacons de récupération et s'assurer que les aiguilles plongent jusqu'au fond des flacons

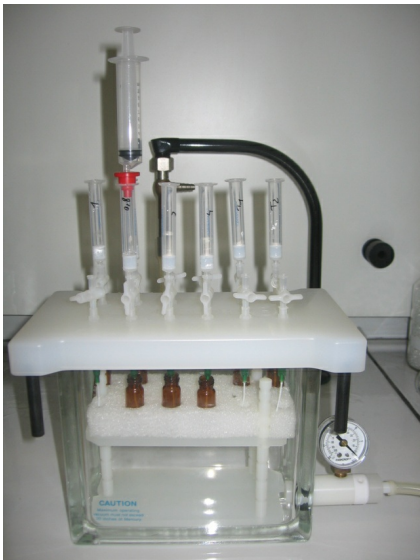
Déposer le solvant en haut de la colonne, laisser passer au-travers de la colonne par gravité, recueillir dans le flacon.

Si la colonne le permet, la technique du backflush avec trois passages successifs permet ensuite d'améliorer le rendement de récupération des mycotoxines :

Aspirer la solution recueillie dans le flacon à l'aide d'une seringue ajustée sur la colonne d'immunoaffinité. Le liquide passe dans la colonne en sens inverse, il est recueilli au-dessus de la phase solide. Laisser repasser la solution au-travers de la colonne par gravité, recueillir dans le flacon. Reproduire cette étape 2 fois de suite.

Récupérer la totalité de l'éluat par soutirage à sec, en douceur et en s'assurant qu'il soit complet, mais sans excès sous peine d'éclaboussures et de perte de produit.

Ci-dessous : photo du dispositif.



Etape de préparation n° 5

Type de préparation _____ ■ Concentration

Evaporations _____ Température 35 °C Gaz d'évaporation Azote

Commentaires:



L'extrait contenu dans les flacons de récupération est évaporé à sec sous flux d'azote de la façon suivante :

Déposer les flacons, sans leur bouchon, dans les blocs de l'évaporateur prévu à cet effet (T=35°C, débit d'azote 0,4 PSI).

Faire descendre les aiguilles au dessus des flacons sans qu'elles ne trempent dans l'extrait.

Effectuer cette étape de concentration pendant 1 heure à 1 heure 30.

Descendre les aiguilles au fur et à mesure de l'évaporation.

Lorsque l'extrait est complètement évaporé : retirer les flacons, remettre leur bouchon pour effectuer la pesée du flacon contenant le résidu sec.

Reprendre le résidu par 200 µL de solvant.

Dérivation

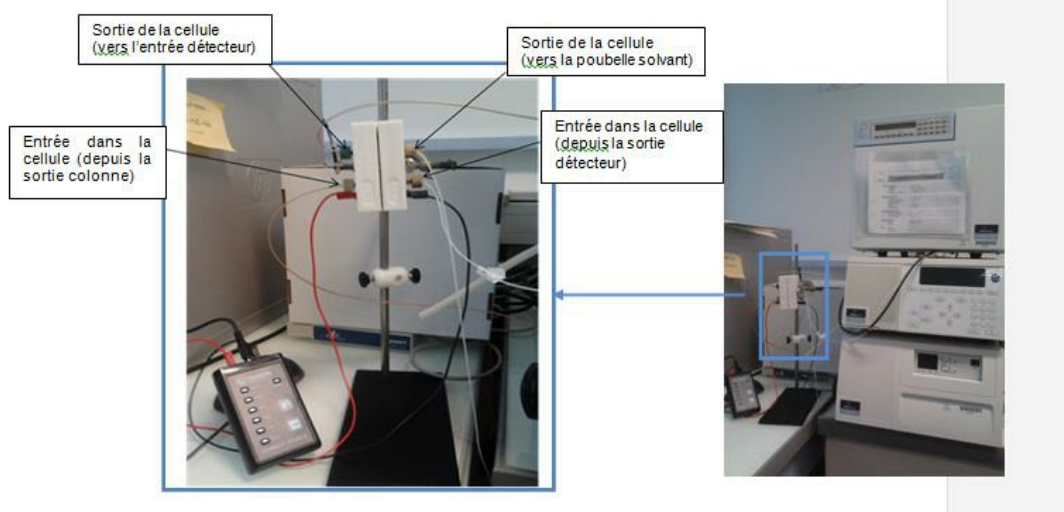
Moment de la dérivation _____ lors d'un traitement post-colonne

Réactif _____ ■ BROME

Nom du/des dérivé(s) formé(s) et numéro(s) CAS correspondants :

Dérivés bromés des aflatoxines B1 et G1 qui ne fluorescent que très faiblement naturellement (contrairement aux aflatoxines B2 et G2).

Commentaires :



Recommandations :

Pour assurer un temps d'analyse optimal du dérivé formé, la longueur de la tubulure entre la cellule de dérivation et l'entrée du détecteur doit être déterminée en fonction de son diamètre interne et du débit. Elle sera par exemple, de 34 cm si le diamètre interne est de 0,5 mm avec un débit 1 mL/min.

Ne jamais laisser la cellule de dérivation au brome sous un flux d'acétonitrile pur.

Stocker la cellule de dérivation au brome sous 100 % d'eau après l'avoir conditionnée à faible débit sous acétonitrile/eau v/v (50/50).

Description

Montage d'un système de dérivation post-colonne (Kobra cell) ou équivalent.

Commentaires, conseils ou conditions particulières

Pour assurer un temps d'analyse optimal du dérivé formé, la longueur de la tubulure entre la cellule de dérivation et l'entrée du détecteur doit être déterminée en fonction de son diamètre interne et du débit. Elle sera par exemple, de 34 cm si le diamètre interne est de 0,5 mm avec un débit 1 mL/min.

Ne jamais laisser la cellule de dérivation au brome sous un flux débit d'acétonitrile pur.

Stocker la cellule de dérivation au brome sous 100 % d'eau après l'avoir conditionnée à faible débit sous acétonitrile/eau v/v (50/50).

1 condition analytique :

Condition analytique n° 1

Les conditions analytiques utilisées lors du développement de la méthode sont fournies avec les données de validation.

Technique analytique _____ ■ CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

Injecteur _____ ■ PASSEUR A EFFET PELTIER

Colonne _____ ■ PHASE INVERSE C18

Détecteur _____ ■ FLUORIMETRIE

Phase mobile _____ ■ ACETONITRILE

■ EAU

■ METHANOL

Étalonnage et expression des résultats

La technique d'étalonnage utilisée lors du développement de la méthode revêt un caractère obligatoire pour atteindre le niveau de performances indiqué (sensibilité, rendements, précision).

Méthodes d'étalonnage pour la quantification des polluants⁸

⁸ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-etalonage/metropol-analyse-etalonage.pdf>

Principe d'étalonnage _____ externe

Solvant de l'étalon _____ ■ Même solvant que celui des échantillons

Commentaires:

Les solutions étalons sont préparées à partir du produit de référence et purifiées et concentrées (comme les échantillons) sur colonne d'immunoaffinité.

Les informations détaillées sur l'étalonnage sont fournies avec les données de validation (Validation-Compléments pour l'ochratoxine et la zéaralénone ou Validation-Compléments pour les aflatoxines).

Calcul de la concentration atmosphérique⁹

⁹ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-resultat-calcul-concentration/metropol-resultat-calcul-concentration.pdf>

Contacts

metropol@inrs.fr

Bibliographie

Historique

Version	Date	Modification(s) faisant l'objet de la nouvelle version
119/V01.01	01/03/2012	Création
119/V02.01	31/01/2013	Révision de la terminologie Modifications concernant le prélèvement et l'analyse Mise à jour des données de validation Introduction de l'annexe 3
119/V02.02	10/02/2015	Modification de l'écriture des équations (AF) et correction des unités indiquées pour les étalons (pg et non pas ng, pg/mL et non pas ng/mL) dans les calculs des quantités (q) et concentrations (af, AF et afc) Correction d'une indication erronée sur le détail des flacons à installer dans le passeur automatique
M-45/V01	Novembre 2015	Mise en ligne
M-45/V02	Mars 2018	Correction dérivation Ajout d'un chromatogramme
M-45/V03	Janvier 2025	Ajout des informations concernant le lavage des mousses dans le dispositif de prélèvement